

# Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasas por *Aspergillus niger*

## The influence of inoculum concentration on cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger*

*Myriam L. Izarra<sup>1</sup>, Mónica L. Santayana<sup>1</sup>, Gretty K. Villena<sup>1</sup>, Marcel Gutiérrez-Correa<sup>1</sup>*

---

### Resumen

Existe un gran interés por el uso de enzimas lignocelulolíticas en varias industrias, y en la biodegradación de biomasa para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones. Entre las fuentes microbianas de enzimas, *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más utilizados en la producción de enzimas industriales, debido a sus niveles altos de secreción de proteína y a su condición GRAS (generally regarded as safe). El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de la concentración de inóculo en la morfología y producción de celulasas y xilanasas con *A. niger* en cultivo sumergido. Para ello, fueron inoculados matraces de 250 mL con 40 mL de medio con 3% (v/v) de una suspensión de 104 o 108 esporas por mililitro e incubados a 28 °C y 175 rpm durante 120 horas. Se utilizaron 10 g\*L-1 de lactosa como fuente de carbono. En cada caso se determinó la cantidad de biomasa, la proteína extracelular soluble, lactosa residual, actividad celulasa total y xilanasas cada 24 horas. Aunque no hubo un efecto notorio en la morfología de crecimiento, salvo en el color y el diámetro de pellets obtenidos, sí se afectó la  $\mu_{max}$  (0,06 y 0,03 h-1 para 104 y 108 esporas\*mL-1, respectivamente) y la concentración máxima de biomasa. Además, mientras que las productividades volumétricas de celulasa (GFPA) (8,2 y 8,0 UI.\*L-1\*h-1 para 104 y 108 esporas\*mL-1, respectivamente) fueron similares para ambos inóculos, la productividad de xilanasas (GXIL) fue mayor para el inóculo más concentrado (29,7 y 33,4 UI.\*L-1\*h-1 para 104 y 108 esporas\*mL-1, respectivamente). Los resultados indican que la productividad de celulasas y xilanasas está estrechamente relacionada con la concentración de inóculo.

Palabras clave: celulasa, xilanasas, cultivo sumergido, morfología, *Aspergillus niger*.

### Abstract

There is great interest in using lignocellulolytic enzymes in several industries and biomass degradation for producing biofuels and other applications. Among microbial sources of enzymes, *Aspergillus niger* is one of the most used microorganisms in producing industrial enzymes due to its high protein secretion levels and

---

1 Investigadores del Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. gkvch@lamolina.edu.pe mgclmb@lamolina.edu.pe

being generally regarded as safe (GRAS). The present study was aimed at evaluating the influence of *A. niger* inoculum concentration on cellulase and xylanase morphology and production in submerged cultures. 250 mL flasks containing 40 mL culture medium were thus inoculated with 3% (v/v) of either 104 or 108 spores per millilitre suspension and incubated at 28°C and 175 rpm for 120 hours. Lactose (10 g/L) was used as carbon source. The amount of biomass, extracellular soluble protein, residual lactose, total cellulase activity and xylanase activity were determined every 24 hours in each case. Even though there was no notorious effect on growth morphology, except pellet colour and diameter,  $\mu_{max}$  (0.06 and 0.03 h<sup>-1</sup> for 104 and 108 spores/mL, respectively) and maximum biomass concentration were affected. Additionally, while cellulase volumetric productivity (8.2 and 8.0 UI\*L<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> for 104 and 108 spores/mL, respectively) was similar for both inocula, xylanase productivity was greater for the more concentrated inoculum (29.7 and 33.4 UI\*L<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> for 104 and 108 spores/mL, respectively). The results showed that cellulase and xylanase productivity was closely related to inoculum concentration.

Key words: Cellulase, xylanase, submerged culture, morphology, *Aspergillus niger*.

Recibido: diciembre 6 de 2009

Aprobado: noviembre 10 de 2010

## Introducción

Desde 1950, las enzimas lignocelulolíticas han incrementado su importancia en diferentes industrias como en la producción de alimentos, industria textil, industria papelera, agricultura e investigación (Bhat, 2000), principalmente debido a las ventajas que otorgan en la optimización de procesos. Además, por características como: su especificidad de sustrato, el requerimiento de condiciones suaves de pH, temperatura y presión para su actividad (comparando con procesos químicos), su contribución al cuidado del medioambiente haciendo los procesos más limpios y su posibilidad de inmovilización, evitando la presencia de éstas en los productos finales (MacCabe *et al.*, 2002).

Las enzimas lignocelulolíticas incluyen a celulasas y xilanasas. Las celulasas constituyen un sistema enzimático de cuatro enzimas: la endo  $\beta$ -glucanasa, que hidroliza randomizadamente celulosa a glucooligosacáridos; la exo  $\beta$ -glucanasa, que libera glucosa de la celulosa; la celobiohidrolasa, que libera celobiosa de la celulosa cristalina; y la  $\beta$ -glucosidasa (Szijárto *et al.*, 2004). Asimismo, las xilanasas constituyen también un complejo enzimático responsable de la hidrólisis de xilano, siendo las principales

enzimas involucradas la endo-1,4- $\beta$  xilanasas, que rompe los enlaces glucosídicos de la cadena principal de xilano produciendo oligómeros de  $\beta$ -D xilopiranosil, y la  $\beta$ -xilosidasa que hidrolizan xilobiosa y xilano oligosacáridos (Polizeli *et al.*, 2005).

En respuesta a la demanda creciente de estas enzimas, se ha impulsado la investigación y el estudio de diferentes microorganismos lignocelulolíticos. Los hongos filamentosos son la fuente principal de hidrolasas, incluyendo celulasas y xilanasas, debido a su fácil manejo y costos reducidos. Los principales géneros incluyen a *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (MacCabe *et al.*, 2002). *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más utilizados en la producción de enzimas industriales, principalmente por sus altos niveles de secreción de proteína, y su estatus GRAS (generally regarded as safe) (Ward *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2002; De Vries y Visser, 2001).

De otro lado, el sistema de cultivo más empleado en la producción de enzimas comerciales es la fermentación sumergida (MacCabe *et al.*, 2002). En este aspecto, en la producción de enzimas con hongos filamentosos, la morfología es de crucial importancia para lograr

una mayor producción (Villena *et al.*, 2010; Papagianni, 2004; Pazouki y Panda, 2000). Los factores que afectan la morfología incluyen el tipo y concentración de la fuente de carbono, la concentración del inóculo, los niveles de hidrógeno, fósforo y otros minerales traza, el O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> disueltos, el pH y la temperatura, y factores físicos como geometría del fermentador, tipo de agitación, reología y sistema de cultivo (Grimm *et al.*, 2005; Papagianni y Matthey, 2004).

Las principales morfologías desarrolladas en sistemas de fermentación sumergida corresponden al crecimiento miceliar o filamentoso y el crecimiento tipo pellet, este último caracterizado por ser una esfera de micelio. Existen tres tipos principales de pellets, los de centro compacto y contorno laxo, los totalmente compactos, y los de interior vacío debido a autólisis (Pazouki y Panda, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue determinar, mediante cultivo sumergido, la influencia de la concentración del inóculo en la morfología y producción de celulasa y xilanasa de *A. niger* ATCC 10864.

## **Materiales y métodos**

### ***Microorganismo y preparación de inóculo***

Se utilizó *Aspergillus niger* ATCC 10864, el cual fue conservado en cuñas de agar papa dextrosa (PDA). Para obtener el inóculo se cosecharon esporas a partir de cultivos en PDA en matraces de 5 días de crecimiento utilizando 10 mL de solución de Tween 80 al 0,1%. Se realizó el recuento en una cámara Neubauer hasta obtener la concentración final requerida (10<sup>4</sup> o 10<sup>8</sup> esporas por mililitro). Estas suspensiones fueron utilizadas como inóculo.

### ***Medio de cultivo***

La composición del medio de cultivo por litro fue: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4g; urea, 0,3 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,3 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 g;

peptona, 1 g; Tween80, 2 ml; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 mg; MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,6 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 mg; Lactosa, 10 g. El pH final del medio fue 5,5.

### ***Cultivo sumergido***

Cada matraz de 250 mL conteniendo 40 mL de medio fue inoculado con 1,2 mL de suspensión de esporas (3%, v/v). Luego, fueron incubados a 28 °C en un baño agitado a 175 rpm. Se utilizaron dos repeticiones por inóculo para cada día.

### ***Análisis***

La biomasa se determinó por diferencia de peso seco. Para ello, el contenido de cada matraz se filtró por succión con papel de filtro previamente pesado. Luego, el papel filtro fue secado a 80 °C para obtener un peso constante. El filtrado fue recuperado y mantenido en congelación hasta el momento del análisis. Se realizaron cuatro repeticiones por cada análisis.

Se determinó la actividad de celulasa total, como actividad sobre papel de filtro (FPA) y la actividad de xilanasa (XIL) de acuerdo con lo reportado por Ghose (1987) y Dueñas *et al.* (1995). Una unidad internacional (UI) de enzimas se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de producto por minuto (equivalentes de glucosa para FPA y equivalentes de xilosa para xilanasa). La proteína soluble fue determinada por el método de Lowry utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry *et al.*, 1951).

### ***Análisis estadístico***

Los datos fueron analizados por el software Statistical Analysis System (Version 8.1) (SAS® Institute, Inc., Cary, NC, USA) mediante análisis de variancia por el procedimiento de Modelos Lineales Generales y la prueba de Duncan de rangos múltiples para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos.

Las curvas de biomasa fueron obtenidas usando el mejor ajuste de la ecuación logística:

$$x = \frac{x_m}{1 + Ce^{-\mu_m t}}$$

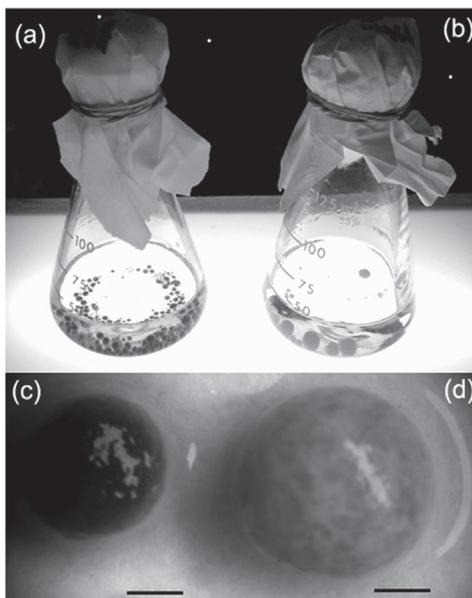
siendo  $C = x_m - x_0/x_m$ ; donde  $x_m$  es la concentración máxima de biomasa,  $x_0$  es la concentración inicial de biomasa, y  $\mu_m$  es la tasa específica máxima de crecimiento. Estos últimos son parámetros identificados por el procedimiento Nilin con el método de Newton del software SAS®.

El análisis de superficie-respuesta para evaluar las variables de actividad de celulasa total, xilanasa y proteína secretada se realizó usando el programa Minitab 14.1 Statistical Software®.

## Resultados

Se evaluó el crecimiento y la producción de enzimas lignocelulolíticas de *A. niger* en cultivo sumergido utilizando concentraciones de inóculo de  $10^4$  y  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup>. Para ambas concentraciones de inóculo se obtuvo

un crecimiento de tipo pellet como se muestra en la figura 1 a, b. La concentración de  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup> generó pellets oscuros y pequeños (figura 1c) mientras que la concentración de  $10^4$  esporas\*mL<sup>-1</sup> generó pellets de color claro y de diámetro variable (figura 1d). Sin embargo, aunque no hubo un cambio evidente en la morfología de crecimiento, sí se afectó la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y la biomasa máxima ( $x_m$ ) de cada cultivo, las cuales fueron 0,03; 0,06 h<sup>-1</sup> y 1,42; 0,48 g\*L<sup>-1</sup> para  $10^8$  y  $10^4$  esporas\*mL<sup>-1</sup>, respectivamente, de acuerdo con los valores obtenidos mediante el mejor ajuste de la ecuación logística ( $R^2 = 0,9$ ) (figura 2a). Asimismo, se advirtió que a menor concentración de inóculo se obtiene una mayor tasa específica máxima de crecimiento, encontrándose una relación lineal inversa entre el logaritmo de la concentración de inóculo y  $\mu_{max}$  ( $R^2 = 0,99$ ). El consumo de lactosa fue lineal en el tiempo y similar en ambos casos como se muestra en la figura 2b. Igualmente, no hubo diferencia significativa ( $p = 0,0001$ ) para el rendimiento de biomasa respecto a sustrato ( $Y_{x/s}$ ) para el día de mayor crecimiento (120 horas), el cual fue 0,14 y 0,13 g\*g<sup>-1</sup> para  $10^8$  y  $10^4$  esporas\*mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 1.** Formación de pellets con inóculo de  $10^8$  (a) y de  $10^4$  (b). (c) pellet de un inóculo  $10^8$ , y (d) pellet de un inóculo  $10^4$ . La barra representa un milímetro.

**Tabla 1.** Comparación de la actividad celulasa total (FPA) y xilanasas (XIL) para inóculos de  $10^4$  y  $10^8$  de *A. niger* en el día de máxima producción

Inóculo	Día de máxima producción de enzima	**FPA (UI*L <sup>-1</sup> )	**XIL(UI*L <sup>-1</sup> )	*Biomasa (g*L <sup>-1</sup> )	**Lactosa residual (g*L <sup>-1</sup> )	** Proteína secretada (g*L <sup>-1</sup> )
$10^4$	5	979 ± 12,73 <sup>a</sup>	3562 ± 2,83 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,050 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,0007 <sup>b</sup>
$10^8$	5	970 ± 84,85 <sup>a</sup>	4010 ± 14,14 <sup>b</sup>	1,05 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,0424 <sup>a</sup>

Los valores representan la media de las dos (\*) o cuatro repeticiones (\*\*) ± DS. Los promedios con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ). Los datos fueron evaluados por ANVA y la prueba de Duncan.

De otro lado, los mayores títulos de FPA y xilanasas (XIL) fueron obtenidos a las 120 horas para ambas concentraciones de inóculo. La tabla 1 muestra los valores correspondientes. Aunque los títulos de actividad FPA fueron semejantes para las dos concentraciones de inóculo, la actividad XIL fue ligeramente mayor para el inóculo de  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup>. Del mismo modo, la concentración de biomasa, consumo de lactosa y concentración de proteína soluble fueron significativamente menores para este inóculo ( $p = 0,0001$ ).

La tabla 2 muestra los principales parámetros de productividad de las dos enzimas evaluadas. Las productividades volumétricas ( $\Gamma_E$ ) de FPA y XIL no mostraron diferencias significativas entre ambos inóculos, sin embargo, los rendimientos aparentes de enzima respecto a biomasa ( $Y_{E/X}$ ) y a sustrato ( $Y_{E/S}$ ), así como la actividad específica de enzima respecto a proteína soluble ( $Y_{E/P_r}$ ), tanto para celulasas como para xilanasas fueron significativamente mayores para el inóculo  $10^4$  esporas\*mL<sup>-1</sup>.

La figura 3 muestra el análisis superficie-respuesta para evaluar la influencia de la concentración de inóculo y el tiempo de cultivo sobre el título de actividad de celulasa total medida como FPA (figura 3a) y actividad de xilanasas, XIL (figura 3c), además de sus respectivos diagramas de contorno (figura 3 b, d, respectivamente). Para este análisis estadístico, el punto central fue tomado de datos referenciales de

título de actividad enzimática (UI\*mL<sup>-1</sup>) para una concentración de inóculo de  $10^6$  (Villena y Gutiérrez-Correa, 2006, 2007) obtenidos bajo las mismas condiciones de cultivo. Los resultados muestran que, entre las dos concentraciones probadas, el inóculo de  $10^4$  esporas\*mL<sup>-1</sup> resulta más adecuado para FPA y XIL en comparación con el inóculo  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup>. Asimismo, las gráficas resultantes del análisis de superficie-respuesta muestran que tanto para FPA y XIL el mayor título de actividad se obtendría con inóculo  $10^6$  esporas\*mL<sup>-1</sup> (figura 3 a, c) para las 72 y 96 horas, respectivamente. De otro lado, el análisis de contorno muestra que las concentraciones teóricas más adecuadas para alcanzar mayor actividad FPA y XIL estarían en el rango de  $10^5$ - $10^7$  esporas\*mL<sup>-1</sup>; entre 55 y 75 horas para la actividad de celulasa y 96 horas para la actividad de xilanasas.

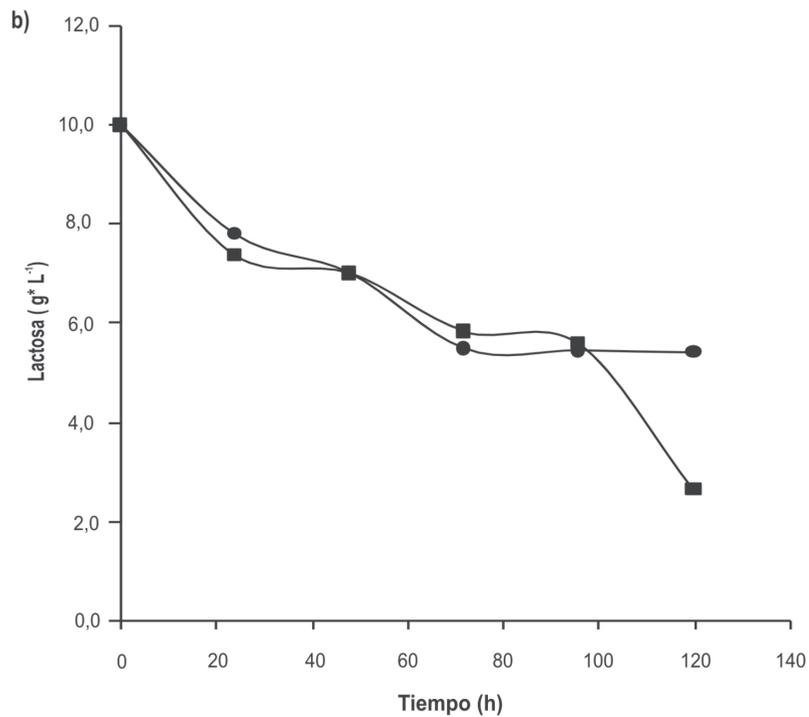
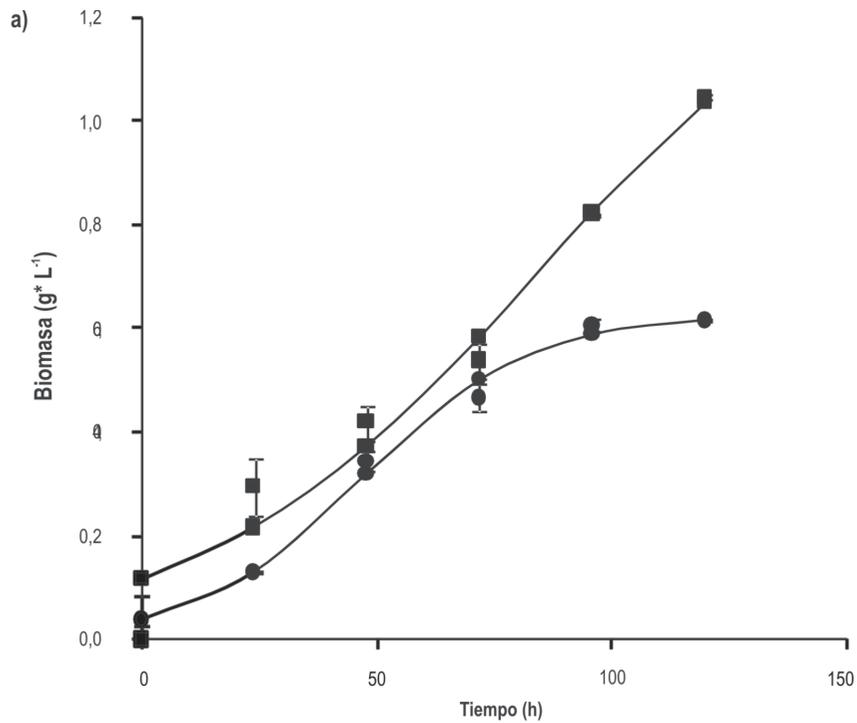
## Discusiones

La morfología de *Aspergillus* está influenciada por varios factores que incluyen las propiedades intrínsecas de cada cepa, la concentración y el tipo de inóculo, la velocidad de agitación, entre otros (El-Enshasy *et al.*, 2006). Para *A. niger* se ha reportado la formación de pellets cuando la concentración del inóculo está por debajo de  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup> (Papagianini, 2004), sin embargo, en el caso de la cepa evaluada, la morfología de pellet se mantiene aún a concentraciones de  $10^8$  esporas\*mL<sup>-1</sup>.

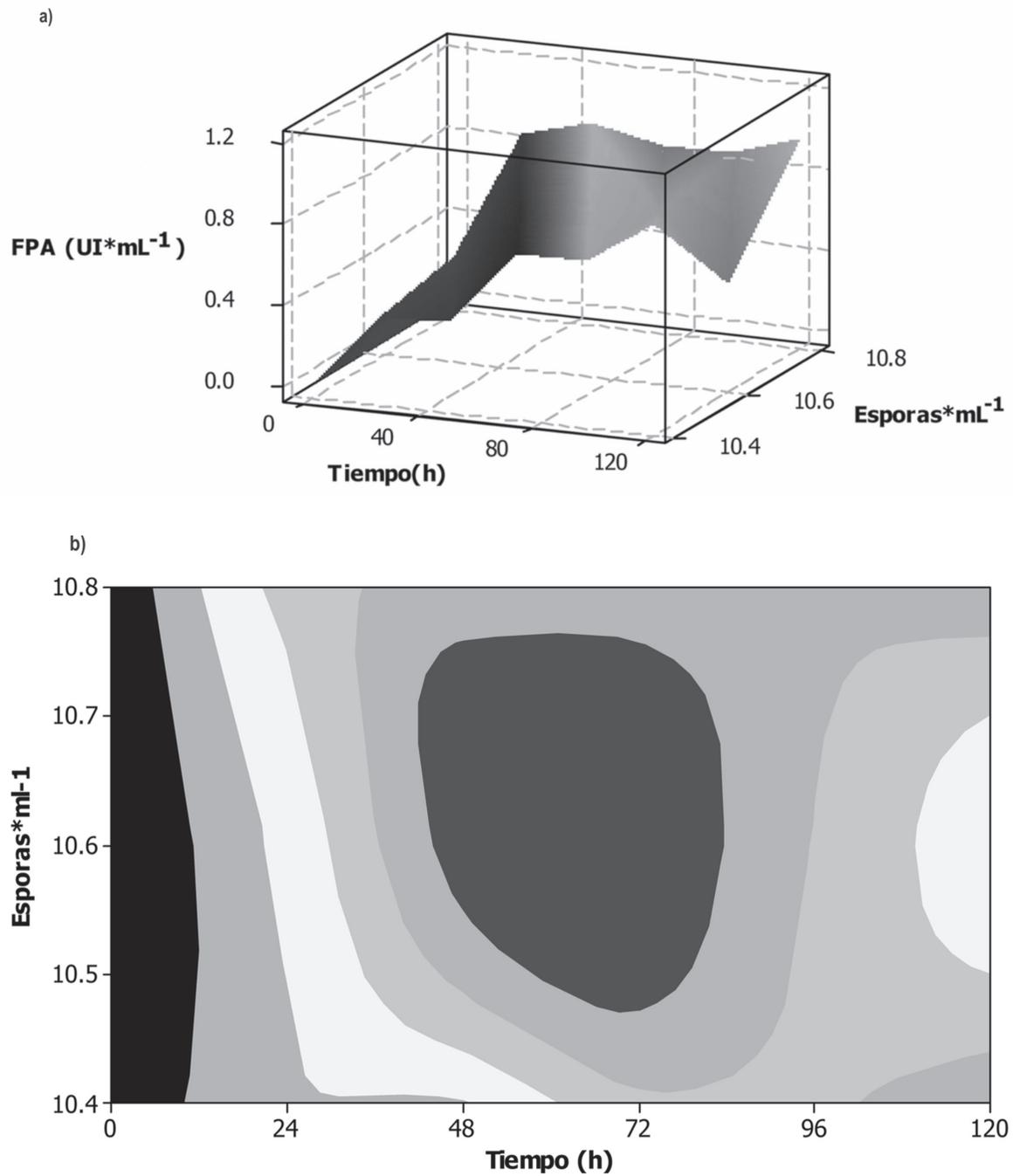
**Tabla 2.** Comparación de los parámetros de productividad de celulasa y xilanasa para inóculo de  $10^4$  y  $10^8$  de *A. niger* en el día de máxima producción

	Inóculo	$Y_{E/X}$ ( $UJ^*g^{-1}$ )	$Y_{E/S}$ ( $UJ^*g^{-1}$ )	$Y_{E/Pr}$ ( $UJ^*g^{-1}$ )	$\Gamma_E$ ( $UJ^*L^{-1}h^{-1}$ )	$\Gamma_X$ ( $g^*L^{-1}h^{-1}$ )	$qE$ ( $UJ^*g^{-1}h^{-1}$ )
Celulasa	$10^4$	$1582,2 \pm 110^a$	$214,8 \pm 0,5^a$	$2173 \pm 31,6^a$	$8,15 \pm 0,11^a$	$0,005 \pm 0,00^b$	$13,19 \pm 0,9^a$
	$10^8$	$928,6 \pm 143^b$	$132,7 \pm 11,5^b$	$1281 \pm 183,1^b$	$8,08 \pm 0,71^a$	$0,009 \pm 0,00^a$	$7,74 \pm 1,2^b$
Xilanasa	$10^4$	$5754,6 \pm 332^a$	$781,7 \pm 7,6^a$	$7906,8 \pm 18,6^a$	$29,68 \pm 0,02^b$	$0,005 \pm 0,00^b$	$47,95 \pm 2,8^a$
	$10^8$	$3827,3 \pm 244^b$	$548,5 \pm 1,9^b$	$5284,0 \pm 276,3^b$	$33,41 \pm 0,12^a$	$0,009 \pm 0,00^a$	$31,89 \pm 2,0^b$

Parámetros de producción:  $Y_{E/X}$  ( $UJ^*g^{-1}$ ) = enzima producida ( $UJ^*L^{-1}$ ) / biomasa formada ( $g^*L^{-1}$ ),  $Y_{E/S}$  ( $UJ^*g^{-1}$ ) = enzima producida ( $UJ^*L^{-1}$ ) / sustrato consumido ( $g^*L^{-1}$ ),  $Y_{E/Pr}$  ( $UJ^*g^{-1}$ ) = enzima producida ( $UJ^*L^{-1}$ ) / proteína secretada ( $g^*L^{-1}$ ),  $Y_{X/S}$  ( $g^*g^{-1}$ ) = Biomasa formada ( $g^*L^{-1}$ ) / sustrato consumido ( $g^*L^{-1}$ ),  $\Gamma_E$  = Productividad volumétrica de enzima,  $\Gamma_X$  = Productividad volumétrica de biomasa. Los valores representan el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  DS. Los promedios con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ). Los datos fueron evaluados por ANOVA y la prueba de Duncan.



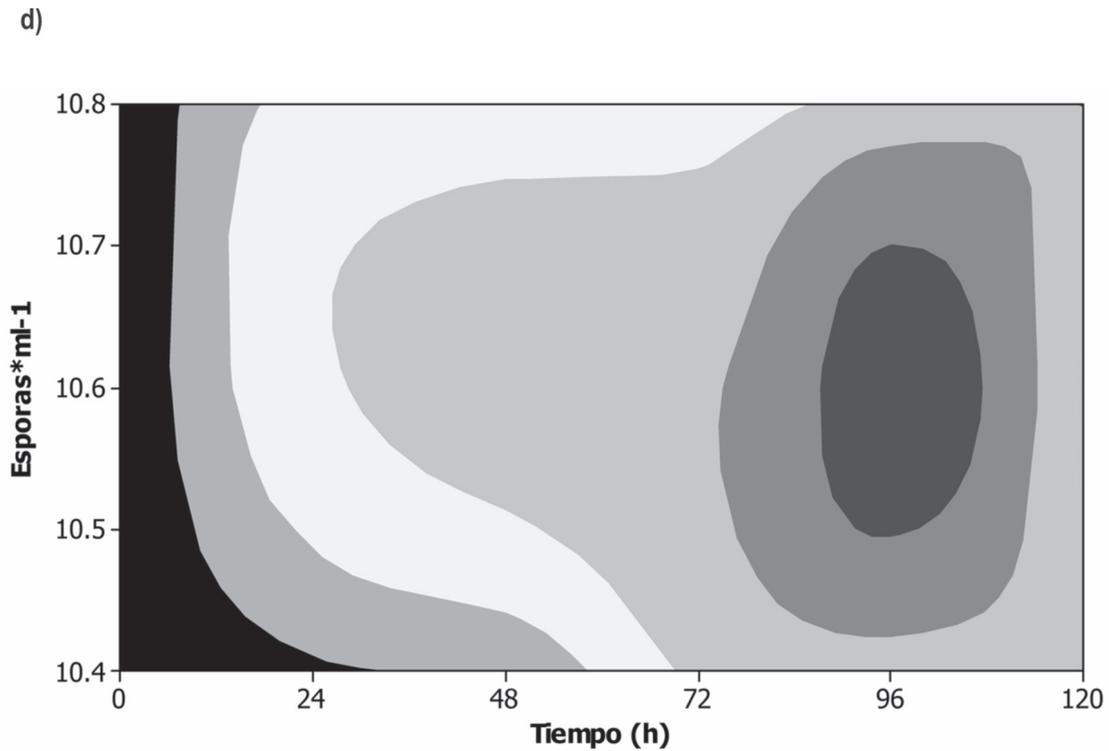
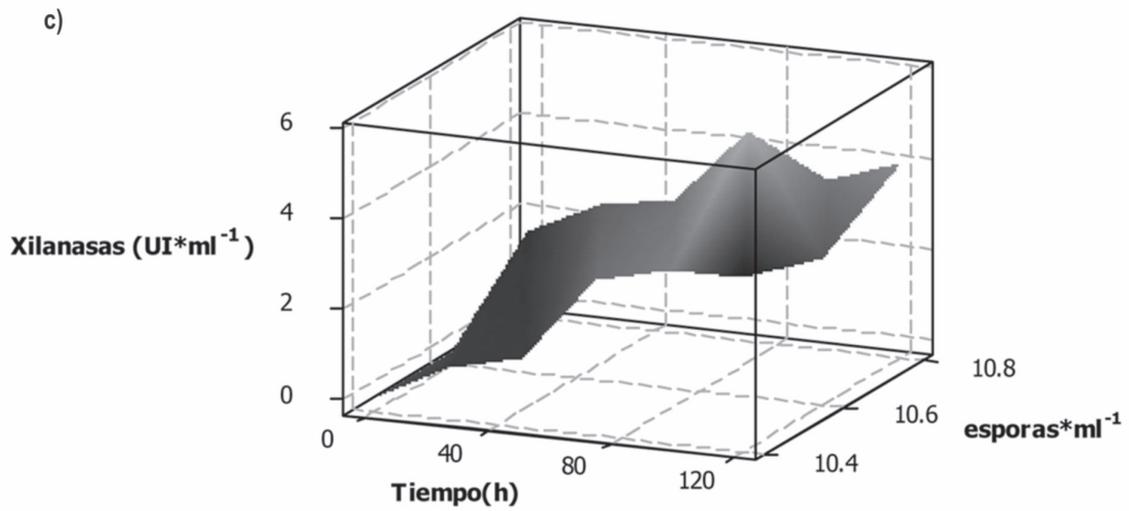
**Figura 2.** Biomasa (a) y Lactosa Residual (b). La cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* con un inóculo  $10^4$  (círculo) y  $10^8$  (cuadrado). Las curvas de biomasa fueron obtenidas usando el mejor ajuste de la ecuación logística,  $x = x_m / (1 + Ce^{-\mu t})$ ,  $C = (x_m - x_0) / x_0$  donde  $x_m$ ,  $x_0$  y  $\mu$  son parámetros identificados por el procedimiento Nilin con el método de Newton del software SAS.



**Figura 3.** Gráficos de superficie-respuesta y sus contornos de nivel.

*Actividad del papel filtro.* (a) Superficie de producción de celulasa ( $U \cdot mL^{-1}$ ), con un inóculo de  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$ , en 5 días; (b) contornos de nivel, indicado la actividad de celulasa ( $U \cdot mL^{-1}$ ) por colores: azul =  $<0 - 0,2>$ , celeste =  $<0,2 - 0,4 >$ , melón =  $<0,4 - 0,6>$ , verde limón =  $<0,6 - 0,8>$ , verde claro =  $<0,8 - 1>$ ,  $<$ verde oscuro $>1$ .

Analizado por el Minitab.



**Figura 3.** Gráficos de superficie-respuesta y sus contornos de nivel.

*Actividad de la xilanasas.* (c) Superficie de producción de xilanasas ( $U \cdot mL^{-1}$ ), con un inóculo de  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$ , en 5 días; (d) contornos de nivel, indicado la actividad de xilanasas ( $U \cdot mL^{-1}$ ) por colores: azul = <0 - 1>, celeste = <1 - 2>, melón = <2 - 3>, verde limón = <3 - 4>, verde = <4 - 5>, verde oscuro >5. Analizado por el Minitab.

Asimismo, se observó la formación de los pellets a partir de las 24 horas, los cuales fueron de tipo coagulativo, caracterizados por una agregación inicial de las esporas y micelio entrelazado, como ha sido reportado anteriormente (Villena y Gutiérrez-Correa, 2007; Znidarsic y Pavko, 2001; Pazouki y Panda, 2000; Ryoo y Choi, 1999). De otro lado, la diferencia en la concentración de esporas puede explicar el aspecto de los pellets obtenidos en cada caso. El color oscuro de pellets formados a la concentración de  $10^8$  esporas\* $mL^{-1}$  pudo deberse a inhibidores-propios, que inhiben la germinación de esporas cuando están en altas concentraciones (Barrios-González *et al.*, 1989). También, el tamaño de los pellets, particularmente para *A. niger*, se explica por el equilibrio termodinámico que existe entre la superficie del pellet y el medio; la alta hidrofobicidad de las esporas rompe la tensión superficial del medio dando lugar al crecimiento en forma de pellet, mientras mayor sea el inóculo, menor será la tensión superficial del medio y más pequeños los pellets formados (Ryoo y Choi, 1999). Los tamaños de pellets obtenidos en cada caso son coincidentes con este comportamiento.

De otro lado, la morfología desarrollada por un microorganismo tiene una marcada influencia en la productividad. Para la producción de cada enzima o metabolito se tiene una morfología apropiada con la cual se alcanza una productividad óptima; por ejemplo, para la producción de ácido cítrico por *A. niger* y de ácido itacónico por *Aspergillus terreus* se prefiere el crecimiento en forma de pellets, mientras que para la producción de penicilina se desea el crecimiento en forma de pellets y filamentos. Para la producción de enzimas pécticas por *A. niger* y para la producción de ácido fumárico por *Rhizopus arrhizus* se desea el crecimiento filamentoso (Pazouki y Panda 2000), aunque se ha reportado una mayor producción de celulasas con *A. niger* en microcolumnas de burbujeo aireadas con oxígeno puro, en las cuales se obtuvo crecimiento disgregado (Villena y Gutiérrez-Correa, 2006).

De acuerdo con los resultados, la productividad volumétrica ( $\Gamma_{FPA}$ ) de celulasa obtenida fue similar para las dos concentraciones de inóculo probadas, pero resultaron menores que la productividad volumétrica reportada para un inóculo de  $10^6$  esporas\* $mL^{-1}$  ( $\Gamma_{FPA} = 16,4 \text{ UI} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) en las mismas condiciones de trabajo para morfología tipo pellet (Villena y Gutiérrez-Correa, 2006). En xilanasas, se observó una mayor productividad volumétrica para la concentración  $10^8$  esporas\* $mL^{-1}$ ; sin embargo, las productividades para las dos concentraciones de inóculo también fueron menores que las reportadas para  $10^6$  esporas\* $mL^{-1}$  ( $= 53,1 \text{ UI} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Por el contrario, las productividades específicas para ambas enzimas, a las dos concentraciones de inóculo, fueron mayores que las reportadas para  $10^6$  esporas\* $mL^{-1}$  ( $q_{FPA} = 6,1$  y  $q_{XIL} = 19.8 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente) (Villena y Gutiérrez-Correa, 2007).

De otro lado, los niveles de celulasas fueron menores a los reportados por otros autores para *A. niger* (Subramaniyan y Prema, 2002; Narasimha *et al.*, 2000) y otras cepas celulolíticas (Domingues *et al.*, 2000, 2001) en diferentes medios, mientras que los títulos de xilanasas fueron similares o menores a los obtenidos en otros estudios con diferentes fuentes de carbono (Subramaniyan y Prema, 2002; Ghokale *et al.*, 1986). Sin embargo, fueron superiores a los obtenidos por Chipeta *et al.* (2005) con la misma cepa de *A. niger* utilizando inóculo miceliar y xilosa como fuente de carbono.

El cultivo sumergido otorga grandes ventajas, pues permite el modelamiento y escalamiento, facilita el procesamiento de salida, reduce la viscosidad del medio e incluso se pueden reutilizar los pellets para un proceso continuo, donde también se evita el crecimiento de micelio libre en las paredes y en la turbina (Znidarsic y Pavko, 2001).

## Conclusiones

La concentración inóculo de esporas no muestra una marcada influencia en la morfo-

logía desarrollada por *A. niger* ATCC 10864 en frascos agitados de cultivo sumergido, la cual fue del tipo pellet. Sin embargo, esta influye considerablemente tanto en la velocidad de crecimiento como en la producción de celulasas y xilanasas, existiendo una relación lineal inversa entre el logaritmo de la concentración de inóculo y la tasa específica máxima de crecimiento  $\mu_{max}$ . Aunque no se evidencia una diferencia significativa de la productividad volumétrica ( $\Gamma_{FPA}$ ) de celulasa para las dos concentraciones de inóculo probadas, en xilanasas sí se obtiene mayor productividad volumétrica para la concentración  $10^8$  esporas $\cdot$ mL $^{-1}$ . En ambos casos las productividades específicas de celulasas y xilanasas (UI $\cdot$ g $^{-1}$  $\cdot$ h $^{-1}$ ) fueron superiores a las obtenidas en estudios anteriores para otra concentración de inóculo.

### Referencias bibliográficas

- Barrios-González, J., Martínez, C., Aguilera, A., Raimbault, M. 1989. Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 11: 551-554.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology review. *Biotechnology Advances*, 18: 355-383.
- Chipeta, Z., du Preez, J. C., Szakacs, G., Lew, C. 2005. Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 71-78.
- De Vries R., Visser J. 2001.** *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**: 497-522.
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 394-401.
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P. 2001. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing in soluble carbon source. *Biotechnology Letters*, 23: 771-775.
- Dueñas, R., Tengerdy, R. P., Gutiérrez-Correa, M. 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 333-337.
- El-Enshasy, H., Kleine, J., Rinas, U. 2006. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 41: 2103-2112.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulolytic activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59: 257-268.
- Gokhale, D. V., Puntambekar, D. S., Deobagkar, D. N. 1986. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnology Letters*, 8 (2): 137-138.
- Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R., Hempel, D. C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 375-384.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MacCabe, A. P., Orejas, M., Tamayo, E. N., Villanueva, A., Ramón, D. 2002. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans* Review. *Journal of Biotechnology*, 96: 43-54.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Chandra, S. M., Rajadeskhar Reddy, B. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 5: 472-476.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22: 189-259.
- Papagianni, M., Mattey, M. 2004. Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. *Process Biochemistry*, 39: 1963-1970.
- Pazouki, M., Panda, T. 2000. Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess Engineering*, 22: 127-143.
- Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591.
- Ryoo, D., Choi, C. 1999. Surface thermodynamics of pellet formation in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 21: 97-100.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisval, J.C., van Dijk, P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:426-435.

- Subramaniyan, S., Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 33-64.
- Szijarto, N., Szengyel, Z., Lidén, G., Réczey, K. 2004. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113: 115-124.
- Villena, G. K., Gutiérrez-Correa, M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilm developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 262-268.
- Villena, G. K., Gutiérrez-Correa, M. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulytic enzyme productivities. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 231-237.
- Villena, G. K., Fujikawa, T., Tsuyumu, S., Gutiérrez-Correa, M. 2010. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser 3 scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology*, 101: 1920-1926.
- Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A. 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 1-75.
- Znidarsic, P., Pavko, A. 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, 39: 237-252.